

Aus dem Institut für Arbeits- und Sozial-Medizin
und der Poliklinik für Berufskrankheiten
der Universität Erlangen-Nürnberg
(Direktor: Professor Dr. med. H.Valentin)

Zur Bestimmung der Delta-Aminolävulinsäure-Dehydratase und ihrer diagnostischen Wertigkeit

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt
von
Wilfried Mache
aus
Stuttgart

1973

D 29

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen
Fakultät der Universität Erlangen-Nürnberg

Dekan: Prof. Dr. Dr. H. Pauly

Referent: Prof. Dr. H. Valentin

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Juli 1973

Zur Bestimmung der Delta-Aminolävulinsäure-Dehydratase und ihrer diagnostischen Wertigkeit*

Th. Haas, W. Mache**, K.-H. Schaller, K. Mache,
G. Klavis und R. Stumpf

Institut für Arbeits- und Sozialmedizin und Poliklinik für Berufskrankheiten
der Universität Erlangen-Nürnberg (Direktor: Prof. Dr. H. Valentin)

Eingegangen am 1. März 1972 / Angenommen am 14. August 1972

The Determination of Delta-Aminolaevulinic Acid Dehydratase Activity and Its Diagnostic Value

Summary. The determination of ALA-D activity in red blood cells as described by Bonsignore and Hernberg was tested for analytical reliability. A modification of this method can be used for the estimation of ALA-D activity in capillary blood.

Glutathion (GSH) and D-penicillamine were added to the incubation mixture to study the effects of substances with sulphhydryl groups on erythrocyte ALA-D activity. The addition of GSH caused an increase in enzyme activity, related to the GSH-concentration. The degree of enzyme activation by GSH (quotient of activity after activation and control activity) depended on the lead content of the blood sample.

The diagnostic value of red cell ALA-D activity was studied on three groups of subjects with varying lead exposure. In all cases normal enzyme assays were performed as well as determinations after GSH-activation. Significant negative correlations were found between blood lead level and ALA-D activity in 53 normal, healthy individuals ($r = -0.65^{***}$), in 44 persons with only slight occupational exposure to lead ($r = -0.72^{***}$) and in 47 heavily exposed workers ($r = -0.53^{***}$). The degree of enzyme activation by GSH depended on the blood lead level within the group of normal subjects ($r = 0.53^{***}$) as well as within the two lead-exposed groups ($r = 0.72^{***}$ and $r = 0.61^{***}$). It could be used as an indicator of lead-induced enzyme inhibition.

The mechanism of enzyme inhibition is discussed. On the basis of the results obtained, ALA-D can be considered a specific and sensitive biochemical parameter of "natural" and occupational lead exposure.

Zusammenfassung. In der vorliegenden Arbeit wurde von verschiedenen Verfahren zur ALA-D-Bestimmung im Vollblut die Methode von Bonsignore u. Hernberg aufgegriffen und auf ihre analytische Zuverlässigkeit hin geprüft. Als Modifikation dieser Methode wird ein Verfahren zur ALA-D-Bestimmung im Capillarblut angegeben.

Darüber hinaus wurde das Verhalten der ALA-D-Aktivität nach Zusatz von SH-gruppenhaltigen Substanzen (Penicillamin und Glutathion) untersucht. Es er-

* Mit Unterstützung durch das Bundesministerium des Inneren.

** D 29.

γ^{***} : $p < 0.001$.

gab sich eine Zunahme der ALA-D-Aktivität mit steigender Konzentration an Glutathion (GSH). Die Aktivierbarkeit der ALA-D durch GSH (Quotient aus Aktivität nach Aktivierung und Ausgangsaktivität) war vom Bleigehalt der betreffenden Blutprobe abhängig.

Die diagnostische Wertigkeit der ALA-D wurde an Hand von Enzymbestimmungen bei drei verschiedenen Kollektiven überprüft. Gleichzeitig wurde die ALA-D-Aktivität in allen Fällen nach Aktivierung mit GSH gemessen. Bei 53 Normalpersonen ließ sich korrelationsanalytisch eine hochsignifikante Abhängigkeit der ALA-D-Aktivität vom Blutbleispiegel ($r = -0,65^{***}$) zeigen. Bei einem Kollektiv von 44 beruflich gering bleibelasteten Personen betrug der entsprechende Korrelationskoeffizient $r = -0,72^{***}$, bei 47 stark bleiexponierten Arbeitern $r = -0,53^{***}$. Die Aktivierbarkeit des Enzyms war sowohl bei den Normalpersonen ($r = 0,53^{***}$) als auch bei den beiden bleibelasteten Kollektiven ($r = 0,72^{***}$, und $r = 0,61^{***}$) vom Blutbleispiegel abhängig. Sie kann als ein Maß für die durch Blei verursachte Enzymhemmung gelten.

An Hand der Ergebnisse sowie von Literaturangaben wird der Mechanismus der Enzymhemmung durch Blei diskutiert. Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse kann die ALA-D als spezifischer und empfindlicher biochemischer Parameter für die usuelle und berufliche Bleibelastung angesehen werden.

1. Einleitung

Die Kondensation von Delta-Aminolävulinsäure (ALA) zu Porphobilinogen (PBG) stellt eine Schlüsselreaktion der Porphyrinsynthese dar und wurde 1953 von Dresel u. Falk [4] beschrieben. Diese Reaktion wird durch ein Enzym katalysiert, welches Gibson 1955 [5] als *Delta-Aminolävulinsäure-Dehydratase* (ALA-D¹) bezeichnete. Etwa gleichzeitig und unabhängig voneinander gaben Granick [7] 1954 sowie Gibson *et al.* [6] 1955 Verfahren zur Isolierung und quantitativen Bestimmung dieses Enzyms an. Über die Struktur, das Molekulargewicht sowie die aktiven Zentren der ALA-D ist bis heute nichts Näheres bekannt. Aus dem Verhalten des Enzyms gegenüber Schwermetallionen und anderen Substanzen, die mit Thiolgruppen reagieren, geht jedoch hervor, daß die ALA-D für ihre Aktivität essentielle Sulfhydrylgruppen enthalten muß (Gibson *et al.* [6]).

Substanzen, die die Aktivität der ALA-D verringern, sind mehrfach beschrieben worden [6, 8]. Darunter sei neben anderen Schwermetallen das Blei hervorgehoben, das auch in vivo den stärksten Hemmeffekt ausübt. Quecksilber und Kohlenmonoxyd [17] besitzen in vitro eine inhibierende Wirkung auf das Enzym. Bei Untersuchungen beruflich Hg-exponierter Personen konnte dies jedoch nicht bestätigt werden (Hernberg *et al.* [12]). Inwieweit Kohlenmonoxyd die ALA-D auch in vivo beeinflußt, ist bisher nicht bekannt. Moore *et al.* [15] fanden 1970, daß die ALA-D-Aktivität abnimmt, wenn exzessive Alkoholmengen verab-

¹***: $p < 0,001$.

1 In der internationalen Enzymnomenklatur wird dieses Enzym entsprechend der katalysierten Reaktion als Porphobilinogen Synthase Nr. 4.2.1.24 bezeichnet.

reicht werden. Das Verhalten der ALA-D bei den verschiedensten — insbesondere hämatologischen und neurologischen — Erkrankungen ist bereits mehrfach untersucht worden. Dabei wird eine Aktivitätsveränderung der ALA-D im allgemeinen abgelehnt [16, 19]. Eingehende Untersuchungen zu diesem Fragenkomplex stehen jedoch noch aus.

Die Bestimmung der ALA-D-Aktivität im Vollblut ist von Bonsignore [1] als spezifische Methode zur Diagnostik von beruflich erworbenen Bleiintoxikationen beschrieben worden. In letzter Zeit wurde die ALA-D von Hernberg *et al.* [11] auch bei beruflich nicht bleiexponierten Personen bestimmt und als geeigneter biochemischer Parameter der usuellen Bleibelastung bezeichnet.

In der vorliegenden Arbeit wird von den in der Literatur beschriebenen Methoden [2, 10, 12, 14, 16, 23] zur Bestimmung der ALA-D im Vollblut die Methode nach Bonsignore u. Hernberg als geeignetes Verfahren aufgegriffen und ihre diagnostische Wertigkeit geprüft.

2. Methodik der ALA-D-Bestimmung

Das Prinzip der verschiedenen Methoden zur Bestimmung der ALA-D-Aktivität basiert darauf, daß das nachzuweisende Enzym mit einer maximalen Substratkonzentration von ALA inkubiert wird. Das in einer bestimmten Zeiteinheit gebildete Porphobilinogen wird mit modifiziertem Ehrlichs Reagens umgesetzt und photometrisch gegen einen Leerwert bestimmt (Gibson *et al.* [6]; Granick u. Mauzerall [8]). Die entstandene Menge Porphobilinogen stellt ein Maß für die Aktivität der ALA-D dar.

Unter Verwendung dieses Prinzips wurde von Bonsignore [1] ein brauchbares Verfahren zur ALA-D-Bestimmung im Vollblut angegeben. Dabei hat Hernberg [12] einen veränderten Modus zur Berechnung der Aktivität vorgeschlagen.

2.1. Arbeitsvorschrift zur Methode der ALA-D-Bestimmung aus Venenblut nach Bonsignore u. Hernberg

Reagentien. 0,01 molare Aminolävulinsäurelösung, 167,6 mg ALA · HCl ad 100 ml mit Phosphatpuffer pH 7,0; 0,1 molare HgCl_2 in 10% Trichloressigsäurelösung (TCE), 2,7 g HgCl_2 ad 100 ml 10% TCE-Lösung.

Modifiziertes Ehrlichs Reagens. 1 g para-Dimethylaminobenzaldehyd wird in ca. 30 ml Eisessig gelöst. Man fügt 16 ml 70% Perchlorsäure hinzu und ergänzt ad 50 ml mit Eisessig. Die Lösung ist etwa 6 Std verwendbar.

Analysengang. Die Bestimmung wird mit Citratblut durchgeführt. Der Hämatokrit des Blutes muß für die Auswertung bekannt sein.

0,2 ml Vollblut werden mit 1,3 ml Aqua bidest. versetzt und 15 min im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Man fügt 1,0 ml ALA-Lösung hinzu. 1,0 ml des Gemisches werden in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert, das 1,0 ml TCE- HgCl_2 -Gemisch enthält. Das entspricht dem Leerwert. Den Rest des Reaktionsansatzes (1,5 ml) inkubiert man 60 min bei 37°C. Man pipettiert 1,0 ml dieses Gemisches in ein zweites

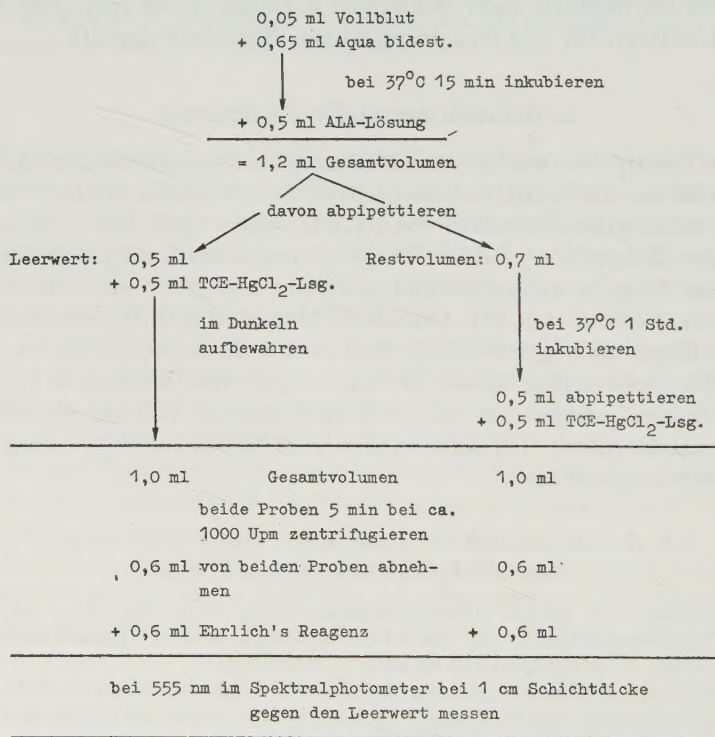
Zentrifugenglas, das 1,0 ml TCE-HgCl₂-Lösung enthält. Dieser Ansatz und der Leerwert werden zentrifugiert. Jeweils 1 ml des Überstandes werden mit 1 ml Ehrlichs Reagens versetzt. Die 60 min-Probe wird nach genau 5 min gegen den Leerwert bei 555 nm bei 1 cm Schichtdicke photometriert.

Berechnung der Aktivität.

$$\text{ALA-D-Aktivität} = \frac{\text{Extinktion} \times 80,6^* \times 10^3}{\text{Hämatokrit in \%}} = \mu\text{mol Porphobilinogen/Std/l Ery.}$$

2.2. Bestimmung der ALA-D-Aktivität aus Capillarblut

Da bei arbeitsmedizinischen und ökologischen Untersuchungen Venenblut nicht immer zur Verfügung steht, erschien es uns zweckmäßig, das Verfahren von Bonsignore [2] für eine Bestimmung im Capillarblut zu modifizieren. Hierbei wurden bei den einzelnen Arbeitsschritten lediglich



$$\text{Berechnung: } \frac{\text{Ext.} \times 154,6 \times 10^3}{\text{HK} \left(\frac{\%}{\%} \right)} = \mu\text{mol PBG/h/l RBC}$$

Abb. 1. Schema der ALA-D-Bestimmung aus Capillarblut

* In dem Faktor $80,6 \times 10$ sind der Verdünnungsfaktor sowie der molare Extinktionskoeffizient von PBG ($6,2 \times 10^4$ l/mol [12]) enthalten.

Tabelle 1. Vergleichende ALA-D-Bestimmungen von 6 Blutproben mit den beiden beschriebenen Methoden

Methode nach Bonsignore			Capillarmethode		
HK (%)	Extinkt.	Aktivität $\mu\text{mol PBG}$ Std. l RBC	HK (%)	Extinkt.	Aktivität $\mu\text{mol PBG}$ Std. l RBC
44	0,214	392	50	0,114	352
39	0,283	568	44	0,161	593
42	0,177	339	48	0,106	341
40	0,403	811	50	0,267	826
41	0,243	478	45	0,135	464
38	0,232	492	44	0,134	471

die Volumenverhältnisse geändert, derart, daß gut meßbare Porphobilinogen-Konzentrationen resultierten. Der Analysengang ist in Abb. 1 schematisch dargestellt.

Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgt für die Capillarmethode nach der Formel:

$$\frac{\text{Extinktion} \times 154,6 \times 10^3}{\text{Hämatokrit in \%}} = \mu\text{mol Porphobilinogen/Std./l Ery.}$$

Dabei sind in dem Faktor 154,6 wiederum der Verdünnungsfaktor sowie der molare Extinktionskoeffizient von Porphobilinogen enthalten. Zur Entnahme des Blutes sind heparinisierte Hämatokritcapillaren erforderlich. Nach gleichmäßiger Durchmischung werden daraus mit Hilfe von Hamilton-Spritzen 50 μl Blut abgemessen. Der weitere Analysengang wird analog dem Verfahren von Bonsignore [2] durchgeführt.

Aus Tabelle 1 ist ersichtlich, daß die errechneten Aktivitäten für die Methode nach Bonsignore [2] und das für Capillarblut modifizierte Verfahren sich nur unwesentlich voneinander unterscheiden.

2.3. Zuverlässigkeitskriterien

Die Reproduzierbarkeit und damit die Genauigkeit der Methode von Bonsignore [2] wurde durch Berechnung des Pearsonschen Variabilitätskoeffizienten von 10 ALA-D-Bestimmungen des gleichen Blutes geprüft. Im Rahmen einer Meßreihe von Routinebestimmungen ergab sich dabei ein Wert von 9,9%. Nach Einführung halbautomatischer Pipettiersysteme wurde die Bestimmung noch wesentlich genauer und war nur mit einem Analysenfehler von 0,9% behaftet. Für Routinebestimmungen schätzen wir jedoch unter diesen Voraussetzungen den methodischen Fehler mit etwa 3–5% ein. Die Genauigkeit der ALA-D-Bestimmung aus Capillarblut wurde mit 2,1% bestimmt.

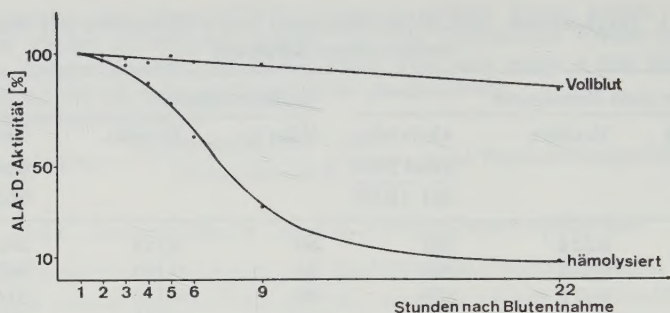


Abb. 2. Prozentuale ALA-D-Aktivität nach unterschiedlich langer Lagerung der Blutproben bis zum Analysenbeginn

2.4. Prüfung der Haltbarkeit des Enzyms

Zur Prüfung der Aktivitätsveränderungen des Enzyms in Abhängigkeit von der Zeit nach der Blutentnahme wurden jeweils vier Proben 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9 und 22 Std nach ihrer Gewinnung analysiert. Es zeigte sich dabei eine kontinuierliche Aktivitätsabnahme für Vollblut, die allerdings erst nach 6 Std ins Gewicht fällt. Wie aus Abb. 2 hervorgeht, nimmt die Aktivität des Enzyms bei vorher mechanisch hämolysiertem und dann entsprechend gelagertem Blut wesentlich schneller ab.

Auf Grund dieser Ergebnisse ist es für Routinebestimmungen erforderlich, die Proben innerhalb von 6 Std nach der Blutentnahme zu analysieren. Bei hämolytischen Blutproben verkürzt sich dieser Zeitraum auf etwa 3 Std. Mittels geeigneter Stabilisatorlösungen ist es unter Umständen möglich, die Enzymaktivität über Tage hinaus zu erhalten. Detaillierte Untersuchungen zu dieser Frage sind noch nicht abgeschlossen.

2.5. Diskussion der Methoden

Vergleicht man die in der Literatur angegebenen Verfahren [20] zur ALA-D-Bestimmung im Blut, so unterscheiden sie sich im wesentlichen in folgenden Punkten:

1. Verwendung von Vollblut oder gewaschenen Erythrocyten,
2. Verfahren zur Hämolyse,
3. Blockierung der Weiterreaktion des entstehenden Porphobilinogens zu Porphyrinen.

Nach Bonsignore [2] verändert sich die ALA-D-Aktivität durch die Hämolyse in Anwesenheit von Plasma nicht. Es ist daher gleichgültig, ob Vollblut oder gewaschene Erythrocyten als Ausgangsmaterial verwendet werden.

Von verschiedenen Autoren [14, 16] werden die Blutproben durch 2maliges Einfrieren und Wiederauftauen hämolysiert. Damit läßt sich

zwar eine vollständige Hämolyse erzielen. Bei Untersuchung von 6 Blutproben, die durch Einfrieren und Wiederauftauen hämolysiert wurden, war jedoch ein deutlicher Aktivitätsverlust gegenüber der Hämolyse auf osmotischem Wege zu verzeichnen.

Die Verknüpfung von 4 Molekülen Porphobilinogen zu Porphyrinen wird durch die Enzyme PBG-Desaminase und PBG-Isomerase katalysiert. Diese Reaktionen werden nach Angaben von Rubino [18] durch hohe Konzentrationen von ALA gehemmt. Die von Bonsignore [2] gewählte ALA-Konzentration (0,01 mol/l) reicht nach unseren Erfahrungen zur Hemmung der Weiterreaktion des entstandenen PBG aus. Es erscheint daher unnötig, die Inkubation des Reaktionsgemisches unter Stickstoffatmosphäre [14, 16] oder im Vakuum [10] durchzuführen. Die Praktikabilität des Verfahrens wird damit für Routinebestimmungen erheblich verbessert.

Von Weissberg *et al.* [23] wurde kürzlich ein Verfahren zur Bestimmung der ALA-D im Capillarblut angegeben, das ebenfalls auf den Arbeiten von Bonsignore [2] basiert. Auf Grund der anderen Volumenverhältnisse entstehen jedoch bei dem hier angegebenen Verfahren wesentlich höhere und damit auch genauer meßbare Porphobilinogenkonzentrationen.

Wie die angegebenen Zuverlässigkeitskriterien zeigen, ist das Capillarverfahren hinsichtlich seiner analytischen Brauchbarkeit durchaus der ALA-D-Bestimmung aus Venenblut vergleichbar. Auf Grund des verhältnismäßig geringen Arbeits- und Zeitaufwandes dürfte es sich auch für ökologische Untersuchungen eignen.

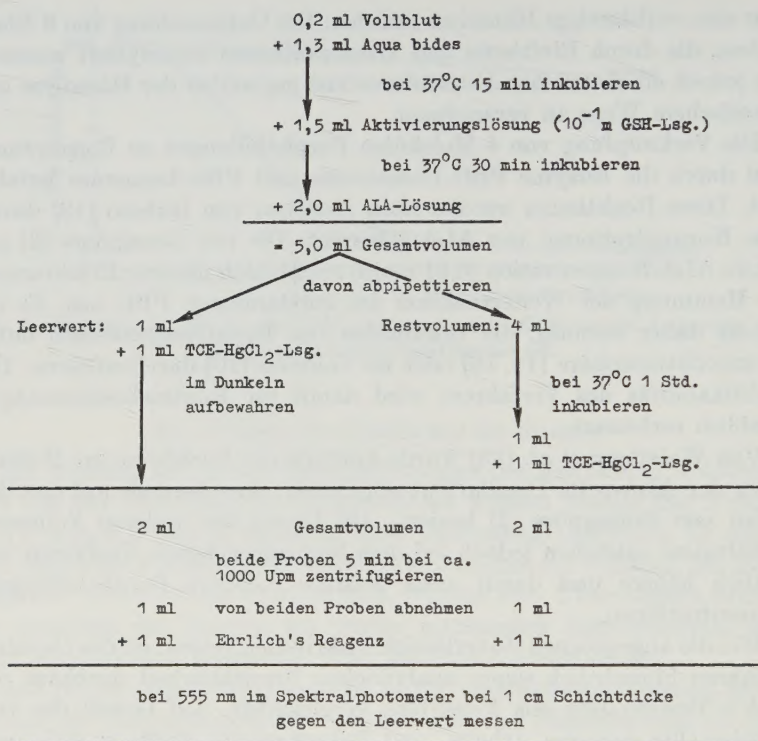
3. Aktivierung der ALA-D mit Komplexbildnern

Um eine maximale Aktivität von gereinigten Enzympräparationen zu erreichen, führten Granick u. Mauzerall [8] eine halbstündige Vorinkubation der Probe mit 0,01 m Glutathionlösung durch. Offenbar werden hierdurch die Thiolgruppen der ALA-D in gewissem Umfang von Schwermetallionen befreit und somit die Enzymaktivität gesteigert.

Gegenstand der folgenden Untersuchungen ist das Verhalten der ALA-D gegenüber verschiedenen SH-gruppenhaltigen Substanzen. Auf Grund ihrer Stabilität in wäßriger Lösung haben sich für diese Versuche Penicillamin (PCA) und Glutathion (GSH) bewährt. Dabei sollte insbesondere geprüft werden, ob die Aktivierbarkeit des Enzyms vom Bleigehalt der betreffenden Blutprobe abhängig ist.

3.1. Methodik der Aktivierung

Zur Aktivierung des Enzyms wurde die Methode von Bonsignore u. Hernberg lediglich unter Einführung eines weiteren Verdünnungsfaktors



$$\text{Berechnung: } \frac{\text{Ext.} \times 161,2 \times 10^3}{\text{HK} (\%)} = \mu\text{mol PBG/h/1 RBC}$$

Abb. 3. Schema der ALA-D-Aktivierung mit Komplexbildnern

modifiziert. Damit sind die errechneten Aktivitäten mit den nach dem Verfahren von Bonsignore u. Hernberg ermittelten Werten direkt vergleichbar.

Der Analysengang ist in Abb. 3 schematisch dargestellt.

3.2. Aktivierungsversuche mit Penicillamin (PCA)

Zu diesen Versuchen wurden wäßrige Lösungen von Penicillamin (Fa. Heyl) in chemisch reiner Form verwandt. Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7 eingestellt. Die Änderung der ALA-D-Aktivität von zwei Blutproben beruflich nicht bleibelasteter Personen nach Zusatz von PCA-Lösungen verschiedener Konzentrationen ist aus Abb. 4 ersichtlich.

Wie aus Abb. 4 ersichtlich ist, nimmt die ALA-D-Aktivität bei steigender PCA-Konzentration zunächst auf das Doppelte zu, um dann wieder abzufallen. Dieser Verlauf ähnelt auffallend dem Verhalten der En-

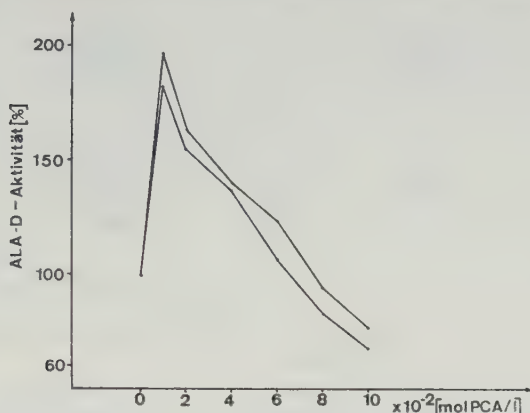


Abb. 4. Abhängigkeit der ALA-D-Aktivität in Prozent von der zugesetzten Penicillamin-Konzentration

zymaktivität gegenüber Cystein (Rubino [18]). Da Penicillamin ein β, β' -Dimethylcystein ist, erscheint diese Tatsache auf Grund der strukturellen Ähnlichkeit beider Substanzen erklärbar.

Bei Zusatz von EDTA in verschiedenen Konzentrationen zeigt sich eine Abhängigkeit der ALA-D-Aktivität von der zugesetzten EDTA-Konzentration in ähnlicher Weise wie bei Zugabe von Cystein und Penicillamin [8, 12]. Nach Angaben von Granick u. Mauzerall [8] sowie Gibson *et al.* [6] bewirkt EDTA in niedrigen Konzentrationen eine, wenn auch vergleichsweise geringe Aktivitätssteigerung. Mit steigender Konzentration nimmt jedoch die Enzymaktivität sehr deutlich ab. Als Ursache für diesen Befund wird eine Komplexbildung von EDTA mit für die Enzymaktivität essentiellen zweiwertigen Ionen angenommen. Möglicherweise spielt für den hier beobachteten Aktivitätsabfall der ALA-D nach Zusatz von Penicillamin in hoher Konzentration ein ähnlicher Mechanismus eine Rolle.

An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, daß die bei unseren Versuchen verwandten PCA-Konzentrationen therapeutisch bei weitem nicht erreicht werden.

3.3. Aktivierungsversuche mit Glutathion (GSH)

Die Aktivierungsversuche mit Glutathion wurden ebenfalls nach dem in Abb. 3 gezeigten Analysengang durchgeführt. Zur Herstellung der GSH-Lösungen wurde die Reinsubstanz in destilliertem Wasser gelöst und der pH-Wert auf 7 eingestellt.

Abb. 5 zeigt das Verhalten der ALA-D-Aktivität von 3 verschiedenen Blutproben nach Vorinkubation mit GSH-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen. Bei allen Blutproben ist eine nahezu lineare Zunahme

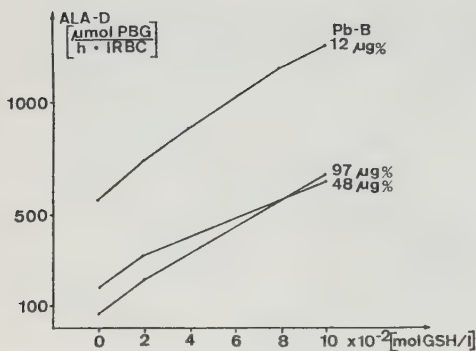


Abb. 5

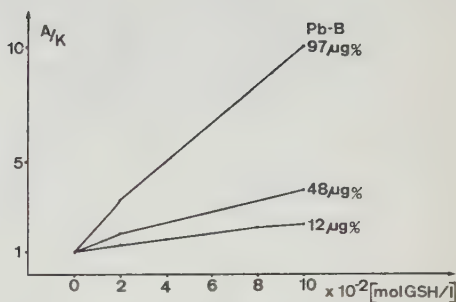


Abb. 6

Abb. 5. Abhängigkeit der ALA-D-Aktivität von der GSH-Konzentration in der Aktivierungslösung

Abb. 6. Abhängigkeit der Aktivierbarkeit der ALA-D von der GSH-Konzentration bei 3 Blutproben mit unterschiedlichem Bleigehalt

der Aktivität mit steigender GSH-Konzentration zu beobachten. Bemerkenswert ist, daß auch bei einer Konzentration von 10^{-1} mol GSH/l noch kein Aktivitätsmaximum erreicht wird.

Das Verhältnis der ALA-D-Aktivität nach Aktivierung mit GSH zur Ausgangsaktivität ist für die verschiedenen Blutproben in Abb. 6 für unterschiedliche GSH-Konzentrationen dargestellt. Hieraus ist ersichtlich, daß die *Aktivierbarkeit der ALA-D* (= Quotient aus Aktivität nach Aktivierung zur Ausgangsaktivität = A/K) bei gleicher GSH-Konzentration mit dem Bleigehalt der Blutprobe zunimmt.

4. Bestimmung der ALA-D-Aktivität bei verschiedenen Kollektiven

Ausgehend von den in Abschnitt 2 und 3 dargestellten methodischen Untersuchungen wurde die ALA-D bei Normalpersonen sowie bei beruflich belasteten Kollektiven bestimmt. Gleichzeitig wurde die Enzymaktivität in allen Fällen nach Aktivierung mit GSH gemessen.

Die ALA-D-Aktivität der Normalpersonen wurde bei 53 beruflich nicht bleiexponierten Probanden bestimmt. Die Enzymbestimmungen wurden nach der Methode von Bonsignore u. Hernberg vorgenommen. Zusätzlich erfolgten Blutblei-Analysen nach dem Verfahren von Lehnert *et al.* [13].

Bei einem mittleren Blutbleispiegel von $13,0 \pm 5,4 \mu\text{g}\%$ ergab sich für die ALA-D-Aktivität ein Mittelwert von $817 \pm 287 \mu\text{mol PBG/Std/l RBC}$. Korrelationsanalytisch zeigte sich eine Abhängigkeit der ALA-D-Aktivität vom Blutbleispiegel, die mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,001$ signifikant war (s. Abb. 7, Tabellen 3 u. 4).

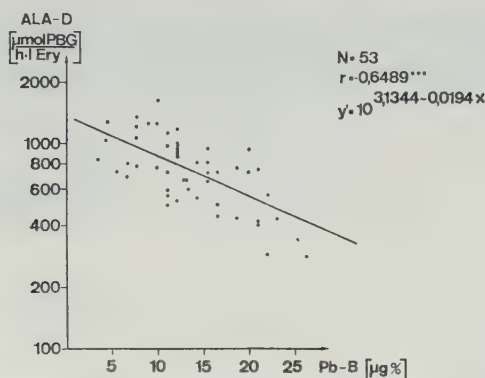


Abb. 7. Abhängigkeit der ALA-D-Aktivität vom Blutbleispiegel bei 53 Normalpersonen

Tabelle 2. Das Verhalten der ALA-D-Aktivität ($\mu\text{mol PBG/Std/l Ery.}$) von 6 Probanden bei täglicher Bestimmung über 5 Tage

1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	$\bar{x} \pm s$	V (%)
598	617	818	820	708	$712,2 \pm 105,9$	14,8
555	556	596		566	$568,2 \pm 19,2$	3,3
1280	1256	1294	1242	1260	$1266,4 \pm 20,6$	1,6
918	952	982	932	986	954 ± 30	3,1
744	711	762	840	793	$770 \pm 49,1$	6,3
805	848	893	840	866	$850,4 \pm 32,5$	3,8

Auf Grund der breiten Streuung der ALA-D-Aktivität bei dem Normalkollektiv wurde ferner geprüft, ob ähnliche *Schwankungen bei ein und demselben Individuum während eines längeren Zeitraumes* vorkommen. Dazu wurden tägliche ALA-D-Bestimmungen bei 6 Personen über 5 Tage vorgenommen (Ergebnisse s. Tabelle 2).

Die mittlere Schwankung der Enzymaktivität bei den einzelnen Probanden wurde varianzanalytisch berechnet und ist mit 6,5% kaum vom methodischen Fehler verschieden. Es kann daher angenommen werden, daß sich die Enzymaktivität von Einzelpersonen während des untersuchten Zeitraumes nur unwesentlich ändert. Für die starke Streuung der ALA-D-Aktivitäten bei beruflich nicht bleiexponierten Personen könnte daher außer dem Grad der Bleibelastung auch eine interindividuell verschiedene Enzymausstattung verantwortlich sein.

Auf Grund der oben gezeigten Ergebnisse kann bei Normalpersonen eine mittlere ALA-D-Aktivität von etwa 800 $\mu\text{mol PBG/Std/l Erythrocyten}$ angenommen werden. Die untere Normgrenze wurde kürzlich von uns [9] mit 250 $\mu\text{mol PBG/Std/l Erythrocyten}$ angegeben. Dieser Wert

Tabelle 3. Zusammenstellung der Mittelwerte mit Standardabweichungen von Blutbleispiegel (Pb-B), ALA-D-Aktivität und ALA-D-Aktivität nach Aktivierung von Normalpersonen und zwei unterschiedlich stark bleibelasteten Kollektiven

	<i>n</i>	Pb-B ($\mu\text{g}\%$)	ALA-D-Aktivität $\left(\frac{\mu\text{mol PBG}}{\text{Std} \cdot \text{l RBC}}\right)$	ALA-D-Aktivität nach Aktivierung mit 10^{-1} m GSH $\left(\frac{\mu\text{mol PBG}}{\text{Std} \cdot \text{l RBC}}\right)$
Normalpersonen	53	$12,99 \pm 5,36$	817 ± 287	1378 ± 328
Mäßig bleibelastetes Kollektiv	44	$32,93 \pm 16,24$	337 ± 230	1015 ± 334
Stark bleibelastetes Kollektiv	47	$104,76 \pm 24,76$	34 ± 16	966 ± 201

entspricht der unteren Grenze des 3 s-Bereichs der logarithmierten ALA-D-Aktivitäten von 99 Normalpersonen.

Zur Überprüfung der diagnostischen Wertigkeit der ALA-D-Bestimmung in der *Überwachung von Bleiarbeitern* wurde das Enzym (zusammen mit dem Blutbleispiegel) bei zwei unterschiedlich stark belasteten Kollektiven untersucht. Es handelte sich einmal um 44 Beschäftigte eines Kabelwerkes, die auf Grund guter arbeitsschutztechnischer Vorrichtungen insgesamt nur gering exponiert waren. Aus der Altbleiaufarbeitung eines zweiten Betriebes wurden 47 Probanden untersucht, bei denen mit einer beträchtlichen Bleiexposition gerechnet werden mußte.

Bei dem mäßig bleibelasteten Kollektiv des ersten Betriebs wurde eine mittlere ALA-D-Aktivität von $337 \pm 230 \mu\text{mol PBG/Std/l RBC}$ gemessen (s. Tabelle 3). Der Unterschied der ALA-D-Aktivitäten zwischen dem Normalkollektiv und dem bleibelasteten Kollektiv war mit $t = 8,9***$ hochsignifikant. Bei einem mittleren Blutbleispiegel von $32,9 \pm 16,2 \mu\text{g}\%$ ergab sich für die Beziehung Blutbleispiegel—log ALA-D-Aktivität dieses Kollektivs ein Korrelationskoeffizient von $r = 0,72***$ (s. Abb. 8, Tabellen 3 u. 4).

Bei dem stark bleibelasteten Kollektiv fand sich eine mittlere ALA-D-Aktivität von $34 \pm 16 \mu\text{mol PBG/Std/l RBC}$ (s. Tabelle 3) und ein mittlerer Blutbleispiegel von $105 \pm 24 \mu\text{g}\%$. Die Enzymaktivität war hier mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,53***$ vom Blutbleispiegel abhängig (s. Tabelle 4).

Die bei den verschiedenen Kollektiven gefundenen Mittelwerte der ALA-D-Aktivität nach Aktivierung mit GSH sind ebenfalls aus Tabelle 3

$t***, r***: p < 0,001.$

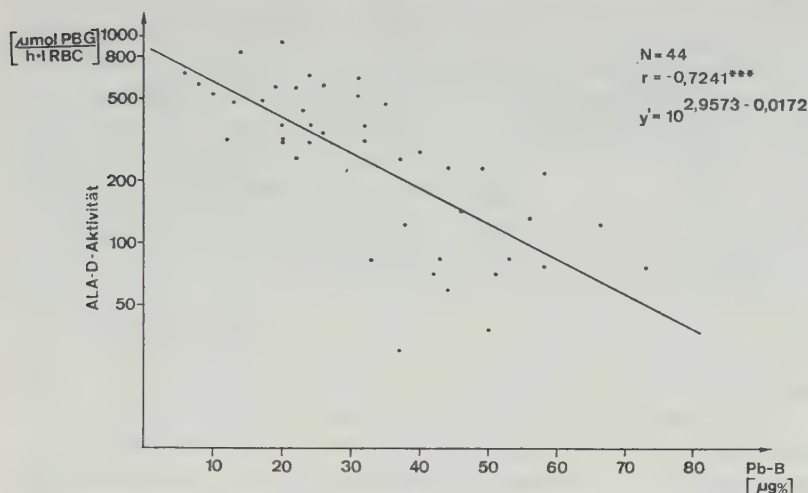


Abb. 8. Abhängigkeit der ALA-D-Aktivität vom Blutbleispiegel bei 44 beruflich bleibelasteten Probanden

Tabelle 4. Korrelationskoeffizienten und Regressionsfunktionen für den Zusammenhang zwischen Blutbleispiegel (Pb-B) und ALA-D-Aktivität vor und nach Aktivierung sowie ihrer Aktivierbarkeit (A/K)

Beziehung	r	Regressionsgleichung
Normalkollektiv ($n = 53$)		
Pb-B $\rightarrow$ log ALA-D	$-0,6488^{***}$	$y' = 10^{3,1344 - 0,0194x}$
Pb-B $\rightarrow$ log Aktivierung	$-0,5302^{***}$	$y' = 10^{3,3029 - 0,0127x}$
Pb-B log A/K	$+0,5348^{***}$	$y' = 10^{0,1063 + 0,0106x}$
Mäßig bleibelastetes Kollektiv ($n = 44$)		
Pb-B $\rightarrow$ log ALA-D	$-0,7241^{***}$	$y' = 10^{2,9573 - 0,0172x}$
Pb-B $\rightarrow$ log Aktivierung	$-0,2086$	$y' = 10^{3,0417 - 0,0025x}$
Pb-B $\rightarrow$ log A/K	$+0,7258^{***}$	$y' = 10^{0,1129 + 0,0145x}$
Stark bleibelastetes Kollektiv ($n = 47$)		
Pb-B $\rightarrow$ log ALA-D	$-0,5291^{***}$	$y' = 10^{1,9719 - 0,0047x}$
Pb-B $\rightarrow$ log A/K	$+0,1972$	$y' = 10^{2,9022 + 0,0007x}$
Pb-B $\rightarrow$ log A/K	$+0,6118^{***}$	$y' = 10^{0,9424 + 0,0053x}$

$r^{***}: p < 0,001.$

ersichtlich. Dabei unterscheiden sich die mittleren Aktivitäten der Normalpersonen und der Bleiexponierten mit $t = 5,4^{***}$ signifikant voneinander, während die beruflich belasteten Kollektive trotz ihrer stark unterschiedlichen Exposition annähernd identische Mittelwerte aufweisen

$r^{***}, t^{***}: p < 0,001.$

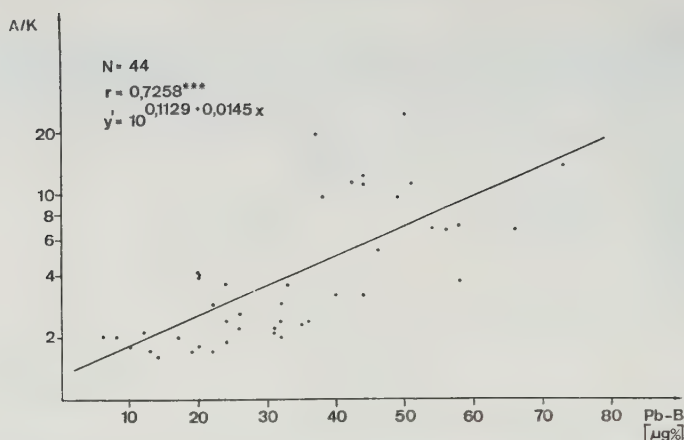


Abb. 9. Abhängigkeit der Aktivierbarkeit der ALA-D (A/K) vom Blutbleispiegel bei 44 beruflich bleibelasteten Personen

($t = 0,86$, s. auch Abb. 10). Korrelationsanalytisch ergab sich eine Abhängigkeit der ALA-D-Aktivität nach Aktivierung vom Blutbleispiegel bei den Normalpersonen, nicht jedoch bei den Bleiexponierten. Bei allen untersuchten Kollektiven korrelierte die *Aktivierbarkeit der ALA-D* hochsignifikant mit dem Blutbleispiegel (s. Tabelle 4, Abb. 9).

5. Diskussion

Das Verhalten der ALA-D-Aktivität bei Normalpersonen ist bereits mehrfach untersucht worden [2, 10, 11, 14, 19]. Hernberg *et al.* [11] konnten an Hand von Enzymbestimmungen an 26 Normalpersonen erstmals zeigen, daß die ALA-D bereits im Bereich der usuellen Bleibelastung mit dem Blutbleispiegel korreliert ($r = 0,83^{***}$). In den hier vorgelegten Untersuchungen an 53 Normalpersonen fand sich ein entsprechender Korrelationskoeffizient von $r = -0,65^{***}$. Wir können damit die Angaben von Hernberg *et al.* [11] bestätigen, wonach die ALA-D auch eine *biologische Wirkung des usuell aufgenommenen Bleis* anzeigt. Nach den Ergebnissen dieser Autoren war es nicht möglich, einen unteren Grenzwert für den Blutbleispiegel anzugeben, bei dem eine Enzymhemmung nicht mehr stattfindet. Betrachtet man jedoch von den hier untersuchten Probanden diejenigen Personen, deren Blutbleispiegel $10 \mu\text{g}\%$ unterschreitet, so läßt sich eine Korrelation mit der ALA-D-Aktivität nicht mehr sichern ($n = 15$, $r = 0,18$).

Das Verhalten der ALA-D-Aktivität bei stärkerer Bleibelastung des Organismus ist u. a. aus dem Verlauf der Regressionsfunktionen für die

r^{***} : $p < 0,001$.

beiden untersuchten bleiexponierten Kollektive zu entnehmen (s. Tabellen 3 u. 4). Ausgehend von der für das mäßig belastete Kollektiv errechneten Regressionsfunktion konnten unsere Angaben [9] über die arbeitsmedizinisch relevanten Grenzwerte der ALA-D-Aktivität bestätigt werden. Danach sollten Personen mit einer ALA-D-Aktivität unter $60 \mu\text{mol PBG/Std/l RBC}$ als gefährdet gelten.

Im Vergleich zu den Normalpersonen und den mäßig Bleiexponierten verläuft die Regressionsfunktion bei dem stark bleibelasteten Kollektiv deutlich flacher. Auch korreliert hier die Enzymaktivität mit dem Blutbleispiegel weniger gut ($r = -0,53^{***}$).

Diese Befunde deuten darauf hin, daß die ALA-D bei Blutbleispiegeln $> 80 \mu\text{g}\%$ weniger gut geeignet ist, Unterschiede in der Bleibelastung zu charakterisieren. In Übereinstimmung mit Befunden von Weissberg *et al.* [23] wäre damit die Empfindlichkeit der ALA-D als biologischer Parameter zu groß, um die Gefährdungssituation hier noch genauer differenzieren zu können.

Die verhältnismäßig starke Streuung der Meßpunkte um die Regressionsgeraden in Abb. 7 u. 8 legen nahe, daß die absolute Höhe der Enzymaktivität außer durch den Blutbleispiegel noch durch weitere Faktoren beeinflußt wird. Insbesondere wäre hier an eine unterschiedliche Enzymausstattung der Erythrocyten sowie an *andere inhibierende exogene oder endogene Substanzen* zu denken. Das genaue Ausmaß der bleibedingten Aktivitätsminderung kann daher aus der absoluten Höhe der Enzymaktivität nicht genügend genau abgeschätzt werden. Um zusätzlich den durch Blei gehemmten Enzymanteil zu erfassen, wäre eine Bestimmung der Aktivität nach vollständiger Befreiung des Enzyms von Bleiionen nötig. Die Bindung dieser Bleiionen mittels maximaler Glutathion-Konzentrationen und anschließende Messung der resultierenden höheren Aktivität erscheint einer solchen Bestimmung vergleichbar. Danach wäre die Aktivitätserhöhung nach Behandlung des Enzyms mit GSH ein Maß für die durch Blei verursachte Enzymhemmung.

Zur Veranschaulichung ist diese Aktivitätserhöhung für die 3 untersuchten Kollektive in Abb. 10 schematisch aufgetragen.

Vergleicht man die aus Abb. 10 ersichtlichen Aktivitätssteigerungen mit den Untersuchungen Bonsignores [2] über die Aktivierbarkeit der ALA-D mit Cystein, so konnte hier das Enzym bei den beruflich Bleiexponierten wesentlich stärker aktiviert werden. Dafür dürfte in erster Linie die von uns verwandte sehr hohe GSH-Konzentration verantwortlich sein.

Aus Tabelle 4 geht hervor, daß die durch Behandlung mit GSH erzielten Enzymaktivitäten der Normalpersonen mit steigendem Blut-

r^{***} : $p < 0,001$.

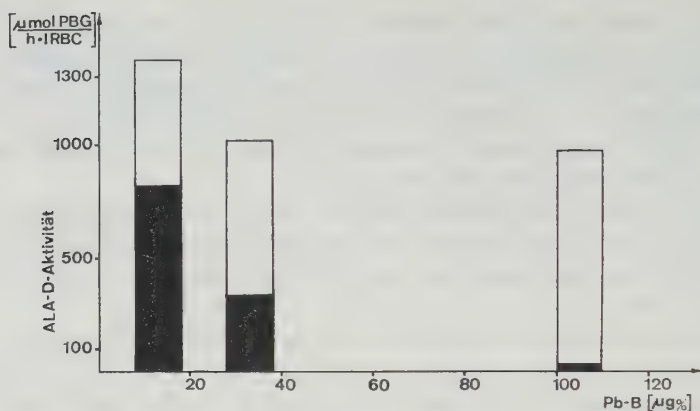


Abb. 10. Mittelwerte der ALA-D-Aktivitäten vor und nach Aktivierung mit GSH bei den Normalpersonen sowie bei verschieden stark beruflich bleibelasteten Kollektiven

bleispiegel abnehmen ($r = -0,53^{***}$). Obwohl dieser Befund darauf hinweist, daß die ALA-D durch GSH nicht vollständig von Bleiionen befreit wird, ließ sich bei allen Kollektiven eine hochsignifikante Abhängigkeit der Aktivierbarkeit der ALA-D vom Blutbleispiegel sichern (s. Tabelle 4). Die Aktivierbarkeit des Enzyms mit GSH kann daher als geeignetes Maß für die durch Blei verursachte Enzymhemmung angesehen werden.

Diese Zusammenhänge lassen sich auch mit Hilfe von theoretischen Überlegungen aufzeigen. Die Affinität eines Metallions zu einer komplexbildenden Substanz läßt sich rechnerisch in der Stabilitätskonstanten ausdrücken. Wesentlich für diese Größe sind die Geschwindigkeiten der Bildung und Dissoziation des betreffenden Komplexes. Aus der Tatsache, daß bei der verwendeten GSH-Konzentration von 10^{-1} mol noch kein Aktivitätsmaximum erreicht wird, kann geschlossen werden, daß der Enzym-Blei-Komplex eine wesentlich höhere Stabilität aufweist als der GSH-Blei-Komplex. Ein weiteres Indiz dafür ist der beachtliche Zeitbedarf, der zur Einstellung des Gleichgewichts zwischen dem ALA-D-Blei-Komplex und dem Glutathion-Blei-Komplex (Granick u. Mauzerall [8]) nötig ist.

Diese Überlegungen zeigen einerseits, daß die Aktivität der ALA-D auch nach Aktivierung durch GSH noch in geringer Weise von Blei beeinträchtigt wird. Andererseits ist auch die Beziehung zwischen der Aktivierbarkeit der ALA-D und dem Blutbleispiegel durch die Einstellung eines Gleichgewichtes zwischen den beiden konkurrierenden Komplexbildnern verständlich.

$r^{***}: p < 0,001$.

Ausgehend von der Stabilitätskonstanten des GSH-Blei-Komplexes, die niedriger ist als die des Enzym-Blei-Komplexes und mit 10,6 l/mol angegeben wird [21], läßt sich aus den vorliegenden Ergebnissen für den ALA-D-Blei-Komplex ein höchstmöglicher Wert dieser Konstanten von ca. 16 l/mol errechnen.

Die Interpretation der Ergebnisse und die theoretischen Überlegungen über die Aktivierungsversuche setzten voraus, daß die Hemmung der ALA-D durch Blei auf einer Komplexbildung des Metallions mit dem Enzymprotein beruht. Die Aktivitätsminderung der ALA-D in Gegenwart von Schwermetallen führten ja auch Gibson *et al.* [6] und Granick u. Mauzerall [8] zur Annahme von essentiellen Sulfhydrylgruppen im Molekül.

Demgegenüber diskutierten Bonsignore [3] und Vergnano [22] auch eine indirekte Hemmung der ALA-D durch einen bei Bleiexponierten vermehrt gebildeten inhibierenden Faktor. Die Autoren fanden nämlich, daß die ALA-D durch kurzfristiges Erhitzen auf 60°C bei Bleibelasteten wesentlich höhere Aktivitäten erreicht als bei Normalpersonen.

In eigenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die ALA-D bei einer Inkubationstemperatur von 42°C in praktisch gleicher Weise durch GSH aktiviert wird wie bei 37°C. Dabei sind die Aktivitäten im Vergleich zu der niedrigeren Inkubationstemperatur deutlich erhöht. Diese Befunde machen einen indirekten Hemmechanismus der ALA-D nicht sehr wahrscheinlich. Sie weisen eher auf eine direkte, kompetitive oder auch allosterische Hemmung des Enzyms durch Blei hin. Der Grad der bleibedingten Enzymhemmung kann dabei mit Hilfe des vorgestellten Aktivierungsverfahrens abgeschätzt werden. Zusammen mit der Ausgangsaktivität des Enzyms, an der in erster Linie die individuelle Gefährdung abgelesen werden kann, liefert die Aktivierbarkeit der ALA-D zusätzliche Informationen über den Grad der Bleibelastung. Insbesondere gilt dies für den arbeitsmedizinisch noch nicht als gefährlich anzusehenden Expositionsbereich.

Literatur

1. Bonsignore, D.: L'attività ALA-Deidratasica eritrocitaria quale test diagnostico nel saturnismo professionale. *Med. d. Lavoro* **57**, 647 (1966).
2. Bonsignore, D., Calissano, P., Cartasegna, C.: Un Semplice Metodo per la Determinazione della Amino-Levulinico-Deidratasi nel Sangue. *Med. d. Lavoro* **56**, 199 (1965).
3. Bonsignore, D., Calissano, P., Cartasegna, C.: Sul Meccanismo di Inibizione da Piombo dell' ALA-Deidratasi Eritrocitaria. *Med. d. Lavoro* **56**, 727 (1965).
4. Dresel, E. J. D., Falk, J. E.: Conversion of δ -aminolaevulinic acid to porphobilinogen in a tissue system. *Nature (Lond.)* **172**, 1185 (1953).
5. Gibson, K. D.: Some properties of δ -aminolaevulinic acid dehydrase. Ciba Foundation Symposium on Porphyrin Biosynthesis and Metabolism. Eds. Wolstenholme, G. E. W., Millar, E. C. P. London: Churchill 1955.

6. Gibson, K. D., Neuberger, A., Scott, J. J.: The purification and properties of delta-aminolaevulinic acid dehydrase. *Biochem. J.* **61**, 618 (1955).
7. Granick, S.: Enzymatic conversion of δ -amino-levulinic acid to porphobilinogen. *Science* **120**, 1105 (1954).
8. Granick, S., Mauzerall, D.: Porphyrin biosynthesis in erythrocytes. II. Enzymes converting delta-aminolevulinic acid to coproporphyrinogen. *J. biol. Chem.* **232**, 11 (1958).
9. Haas, Th., Mache, K., Schaller, K.-H., Valentin, H.: Die Delta-Aminolävulinsäure-Dehydratase als wertvoller biochemischer Parameter bei der Überwachung von Bleiarbeitern. *Arbeitsmed. Sozialmed. Arbeitshyg.* **11**, 303—305 (1971).
10. Heilmeyer, L.: Die Störungen der Bluthämsynthese mit besonderer Berücksichtigung der sidero-achrestischen Anämien und erythropoetischen Porphyrrien. Stuttgart: Thieme 1964.
11. Hernberg, S., Nikkanen, J.: Enzyme inhibition by lead under normal urban conditions. *Lancet* **1970 I**, 63—64.
12. Hernberg, S., Nikkanen, J., Tola, S., Valkonen, S., Nordman, C. H.: Erythrocyte ALA-dehydratase as a test of lead exposure. Internat. Conference on Chem. Poll. and Human Ecology Prague, Oct. 1970.
13. Lehnert, G., Schaller, K.-H., Szadkowski, D.: Eine zuverlässige Schnellmethode zur Bleibestimmung in kleinen Blutmengen. *Z. klin. Chem.* **7**, 310 (1969).
14. Lichtman, H. C., Feldman, F.: In vitro pyrrole and porphyrin synthesis in lead poisoning and iron deficiency. *J. clin. Invest.* **42**, 830 (1963).
15. Moore, M. R., Beattie, A. D., Thompson, G. G., Goldberg, A.: Depression of δ -aminolaevulinic acid dehydrase activity by ethanol in man and rat. *Clin. Sci.* **40**, 81 (1971).
16. Nakao, K., Wada, O., Yano, Y.: Delta-aminolevulinic acid dehydratase activity in erythrocytes for the evaluation of lead poisoning. *Clin. chim. Acta* **19**, 319 (1968).
17. Rausa, G., Diana, L., Perin, G.: Azione in vitro dell' ossido di Carbonio et del piombo sull' attivita dell' enzima acido delta-amino-levulinico deidratasi di eritrociti umani. *Rev. It. Jg.* **28**, 319—327 (1968).
18. Rubino, G. F., Rasetti, L., Teso, G. A.: Enzymic formation of porphobilinogen and porphyrin by the human erythrocyte. *Panminerva med.* **6**, 10 (1964).
19. Rubino, G. F., Teso, G., Rasetti, L.: Erythrocyte delta-amino-laevulinic acid dehydrase in anaemia. *Acta haemat. (Basel)* **24**, 300—310 (1960).
20. Schaller, K.-H., Mache, K., Haas, Th., Mache, W., Valentin, H.: Europ. Gemeinschaft, Dok. Nr. 3107/71d (1970).
21. Sillen, L. G., Martell, A. E.: Stability constants. Special publications No. 17. The Chemical Society 1964.
22. Vergnano, C., Cartasegna, C., Ardoino, V.: Meccanismi di Inibizione dell' Attivita' δ -Amino-Levulinico Deidratasica Eritrocitaria nell' Intossicazione da Piombo Umana e Sperimentale. *Med. d. Lavoro* **60**, 505—516 (1969).
23. Weissberg, J. B., Lipschutz, F., Oski, F. A.: Delta-aminolevulinic acid dehydratase activity in circulating blood cells. *New Engl. J. Med.* **284**, 565 (1971).

Dr. med. Th. Haas
 Institut für Arbeits- und Sozialmedizin
 der Universität Erlangen-Nürnberg
 D-8520 Erlangen
 Schillerstraße 25
 Bundesrepublik Deutschland

Lebenslauf:

Am 12. Oktober 1945 wurde ich als Sohn des Verlagskaufmanns Werner Mache und seiner Ehefrau Helga geb. Pollmann in Stuttgart geboren.

Schulbildung: 1951-1955 Volksschule Stgt.-Möhringen
1955-1961 Progymnasium Stgt.-Hohenheim
1961-1964 Friedrich-Eugens-Gymnasium Stuttgart

Nach bestandener Reifeprüfung leistete ich bis Frühjahr 1966 die Dienstzeit bei der Bundeswehr ab.

Studiengang: 1966-1967 Studium der Medizin an der Universität
Stuttgart-Hohenheim
1967-1970 Studium der Medizin an der Eberhard-
Karls-Universität Tübingen
ab 1970 Studium der Medizin an der Friedrich-
Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

Am 7. Juni 1973 legte ich die ärztliche Prüfung ab.

Seit 29. Mai 1970 bin ich mit Karin geb. Kalbe verheiratet.

